

## ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ $\text{TiO}_2$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4$ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АСПАРАТАТ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

А.Э.Салем, М.В.Шолух

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

*e-mail: ankel2008@gmail.com; sholukh@bsu.by*

### Введение

Наноматериалы и нанотехнологии в последние годы достаточно широко внедряются в различные сферы деятельности человека. Они находят применение в пищевой промышленности, в биологии и медицине. Они используются при производстве косметики, в диагностике, для иммобилизации белков, ферментов и антител, как инструменты целевой доставки лекарственных веществ, магнитных биосенсоров, при получении биологических изображений и многого другого [1, 2]. Использование наночастиц в технологии становится все более распространенным явлением. Продолжение этой тенденции будет обязательно увеличивать экспозицию биологических систем к наночастицам. В результате, крайне важно, понимать как такие биологические объекты как белки, могут взаимодействовать с наночастицами [3, 4] и к каким последствиям это может привести как для самих олигомерных белков, так и для метаболизма на уровне клетки. Количество работ, посвященных изучению влияния НЧ на термостабильность белков достаточно ограничено, и касается относительно простых белков, таких как бычий сывороточный альбумин (БСА) [5], РНКаза [6], трипсин [7]. Ранее нами была установлена возможность взаимодействия олигомерного белка митохондриального изофермента АспАТ (L-аспарат2-оксоглутарат аминотрансфераза; КФ 2.6.1.1; мАспАТ) с НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , НЧ коллоидного золота (НЧЗ) и показано, что в основе данного процесса находятся адсорбционные взаимодействия. При этом установлено – взаимодействие фермента с наночастицами сопровождается изменениями его кинетических параметров [8, 9, 10]. Предполагаемой причиной таких сдвигов являются изменения конформации олигомерной молекулы мАспАТ [10]. Известно, что чувствительность белков к нагреву является одним из наиболее эффективных методов регистрации конформационных изменений происходящих в молекуле. В связи с этим для изучения процесса термоинактивации мАспАТ в присутствии НЧ нами было решено использовать термодинамический подход [11]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния нативных (НЧ- $\text{TiO}_2$ , НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и модифицированных декстран сульфатом (НЧ- $\text{TiO}_2$ ДС и НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ДС) наночастиц (НЧ) на кинетику термоинактивации мАспАТ.

### Методы исследования

мАспАТ выделяли из сердца свиньи согласно [12] в модификации [17] и оценивали чистоту методом SDS-электрофореза в 12% полиакриламидном геле. После перевода в 50 ммоль/л фосфатный буфер с pH 7,5, 0,5 ммоль/л ЭДТА, 20 % глицерола, 0,05% тимерозола и стерилизующей ультрафильтрации фермент аликвотировали в стерильные флаконы и хранили при +4 °С.

Раствор нативных наночастиц (НЧ- $\text{TiO}_2$  и НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и модифицированных сульфат декстраном наночастиц (НЧ- $\text{TiO}_2$ ДС и НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ДС) готовили, как описано нами ранее [9, 10] с учётом рекомендаций Canesi и соавт. [13]. Исследование влияния наночастиц на зависимость активности мАспАТ от температуры проводили следующим образом: 1500 мкл раствора нативных либо покрытых ДС наночастиц с концентрацией 50 мг/л центрифугировали при 12000g 5 мин, надосадочную жидкость отбрасывали. К осадку добавляли 1500 мкл мАспАТ (5 мкг/мл) и суспендировали пипетированием, перемешивали на вортексе и инкубировали 40 минут при комнатной температуре. Затем фермент в закрытых пробирках типа эппендорф инкубировали на водяной бане 10 мин при температурах 50, 55, 60, 65 и 70 °С. Контролем служили образцы фермента без наночастиц.

По завершении инкубации пробы переносили в ледяную баню. Остаточную активность выражали в процентах по отношению к активности непрогретой пробы.

Для изучения влияния нативных либо модифицированных сульфат декстраном НЧ на термоинактивацию мАспАТ, фермент инкубировали с НЧ при температурах 50, 55, 60, 65 и 70 °С. Пробы отбирали через 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, и 40 мин инкубации и помещали в ледяную баню. Затем определяли остаточную активность. Все измерения активности мАспАТ производили при комнатной температуре и концентрации фосфатного буферного раствора 50 ммоль/л, рН 6,8 [10]. Скорость термоинактивации мАспАТ характеризовали константами скорости ( $k_{in}$ ) псевдопервого порядка в мин<sup>-1</sup>, которую определяли из зависимости  $A_i/A_0$  от времени, где  $A_0$  – активность исходного образца фермента, а  $A_i$  – активность аналогичного образца после термообработки. Из полученных данных рассчитывали значения энергии активации ( $E_a^{in}$ ), свободной энергии, энтропии и энтальпии процесса термоинактивации согласно [11].

Содержание белка определяли по Петерсону [14], и по поглощению при 280 нм. Для мАспАТ использовали значение  $A_{280}^{1\%} = 14,0$  [12]. Активность мАспАТ определяли спектрофотометрическим методом [15], как описано нами ранее при комнатной температуре и концентрации фосфатного буферного раствора 50 ммоль/л, рН 6,8. [20].

Для расчетов термодинамических параметров использованы следующие формулы [16]:

$$E_a^{in} = -R \cdot \text{tg} \alpha (1); \Delta G = -2,303 \cdot R \cdot T \cdot [\lg(k_{in}/T) - \lg(R/N \cdot h)] (2);$$

$$\Delta H = E_a^{in} - R \cdot T (3); \Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T (4)$$

где:  $E_a^{in}$  – энергия активации процесса термоинактивации;  $\Delta G$  – свободная энергия Гиббса;  $\Delta H$  – энтальпия процесса термоинактивации;  $\Delta S$  – энтропия процесса термоинактивации;  $\text{tg} \alpha$  – тангенс угла наклона прямой аррениусовской зависимости;  $T$  – температура в градусах; Кельвина;  $R$  – универсальная газовая постоянная-8,314 Дж/К\*моль;  $N$  – постоянная Авогадро  $6,02 \cdot 10^{23}$ ;  $h$  – постоянная Планка,  $6,6252 \cdot 10^{-34}$ ;  $k_{in}$  – константа скорости реакции термоинактивации при температуре  $T_i$ .

Уравнения (1–4) использованы для расчёта констант скорости первой стадии термоинактивации. Результаты исследований обработаны статистически и являются средними пяти независимых экспериментов. Для расчетов и построения графиков использовали программу Excel.

### Результаты и обсуждение

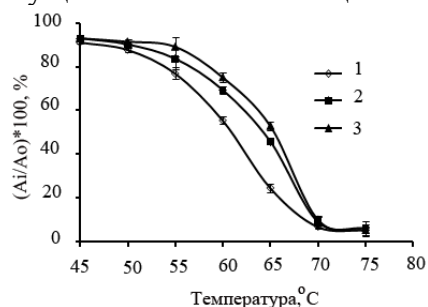
Одним из важнейших общепринятых параметров, характеризующих термостабильность биополимеров, является величина  $t_{1/2}$ , показывающая температуру, при которой происходит потеря 50% ферментативной активности. Величина  $t_{1/2}$  определяется свободной энергией активации белка. Изменения в  $t_{1/2}$  непосредственно связаны с изменениями в сопротивлении адсорбированного белка конформационным сдвигам, происходящим с ним на наночастицах при термоинактивации [17].

На первом этапе работы нами проведена оценка  $t_{1/2}$  мАспАТ в присутствии нативных и модифицированных декстран сульфатом НЧ-TiO<sub>2</sub> (рисунок 1). Так, для свободного от НЧ препарата мАспАТ  $t_{1/2} = 62$  °С, что согласуется с данными [18] тогда как для мАспАТ адсорбированного на НЧ-TiO<sub>2</sub> и НЧ-TiO<sub>2</sub>СД  $t_{1/2}$  повышалась до 65 °С и 67,5 °С соответственно, что указывает на увеличение термостабильности фермента находящегося во взаимодействии с наночастицами.

Для оценки вклада нативных и модифицированных ДС наночастиц в сохранении активности фермента при нагревании было проведено сравнение активности мАспАТ при температуре 60 °С. Установлено, что в отсутствии НЧ-TiO<sub>2</sub> при инкубации в течение 20 мин при данной температуре мАспАТ сохраняет 55,4% своей активности.

Добавление нативных или НЧ-TiO<sub>2</sub>ДС приводит к повышению термостабильности фермента. Так, активность мАспАТ возрастает и составляет 69,2% и 75,08%, соответственно по отношению к активности фермента с НЧ-TiO<sub>2</sub>, без термообработки (рисунок 1). Таким образом, покрытие наночастиц декстран сульфатом способствует повышению

термостабильности мАспАТ на 20%. Такое повышение стабильности адсорбированного мАспАТ, вероятно, связано с увеличением жесткости конформации обусловленной многоточечным связыванием фермента с наночастицами. Согласно [19] в основе многоточечного связывания наночастиц с белками лежат электростатические и гидрофобные взаимодействия, водород склеивание, и другие типы взаимодействий являющихся основной движущей силой стабилизации.



1. Контроль – мАспАТ без НЧ; 2) мАспАТ с НЧ-TiO<sub>2</sub>; 3) мАспАТ с НЧ-TiO<sub>2</sub> покрытыми сульфатом декстрана. Продолжительность инкубации 20 мин

Рисунок 1 – Влияние интактных и модифицированных декстран сульфатом НЧ-TiO<sub>2</sub> на термоинактивацию мАспАТ

Для того, чтобы оценить потенциальное влияние взаимодействия нативных и модифицированных декстран сульфатом НЧ-TiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> с АспАТ на термоинактивацию фермента был использован термодинамический подход. Ранее нами было показано изменение каталитических и кинетических свойств мАспАТ при взаимодействии с НЧ-TiO<sub>2</sub> [20], однако природа данных изменений установлена не была.

В связи с тем, что чувствительность белков к нагреву является одним из наиболее эффективных тестов на конформационную стабильность [11], для изучения влияния наночастиц на данный параметр была изучена кинетика процесса термоинактивации мАспАТ в присутствии нативных и покрытых декстран сульфатом НЧ-TiO<sub>2</sub>, НЧ-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и рассчитаны соответствующие термодинамические параметры. Термоинактивацию мАспАТ проводили при 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C, рН равном 6,8 и концентрации фосфатного буферного раствора 5 ммоль/л. При измерении активности мАспАТ концентрацию фосфатного буфера увеличивали до 50 ммоль/л для диссоциации мАспАТ с поверхности НЧ, как это было показано нами ранее [10]. Полученные результаты представлены на рисунке 2, где скорость процесса термоинактивации является функцией температуры и времени.

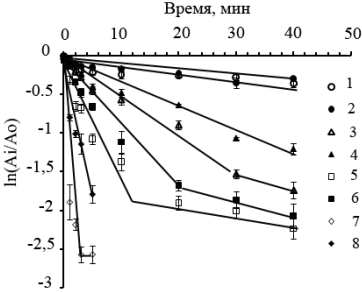
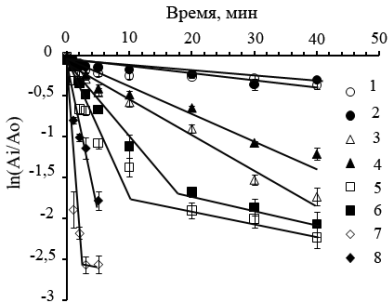
Анализ зависимости термоинактивации мАспАТ от времени воздействия показывает, что при температурах до 65 °C процесс носит одностадийный характер, тогда как при 65 °C и выше процесс протекает уже в две стадии – быструю и медленную.

Причем, время появления излома на прямой, характеризующей зависимость  $\ln(A_i/A_0)$  от продолжительности инкубации сокращается с увеличением температуры (рисунок 2). Двухфазность процесса свидетельствует о переходе фермента в более стабильное, но менее каталитически активное состояние[21], что согласуются с идеей Tsou о том, что активный центр фермента является более конформационно лабильным по сравнению с белковой молекулой в целом [24].

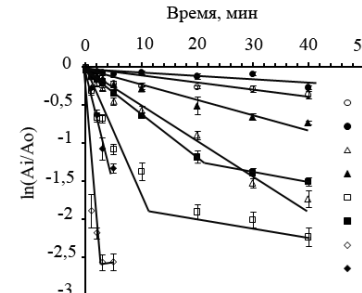
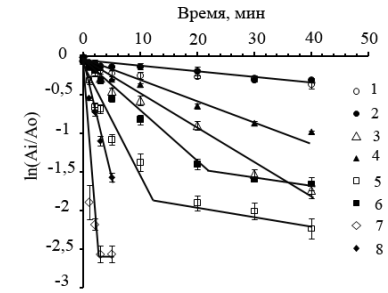
Сравнение скорости инактивации свободного и адсорбированного на поверхности НЧ мАспАТ ясно демонстрирует, что НЧ стабилизируют мАспАТ. Разница между скоростями инактивации свободного и ассоциированного с наночастицами мАспАТ при повышении температуры становится особенно заметна.

С целью количественной оценки эффективности действия НЧ на термоинактивацию мАспАТ из полулогарифмических анаморфоз (рисунок 2) проведен расчет константы скорости первой стадии термоинактивации ( $k_{in}$ ). Полученные результаты представлены в таблице 1. Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее эффективно как нативные, так и модифицированные декстран сульфатом НЧ проявляют своё термопротекторное действие при температуре выше 60 °C. При этом НЧ на основе TiO<sub>2</sub> обеспечивают наиболее выраженное сопротивление мАспАТ развитию термоинактивации.

А Б



В Г



А) мАспАТ + нативные НЧ- $\text{TiO}_2$ ; Б) мАспАТ +НЧ- $\text{TiO}_2\text{ДС}$ ; В) мАспАТ + нативные НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; Г) мАспАТ + нативные НЧ-  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ДС}$ ; 1,3,5,7 фермент без наночастиц; 2,4,6,8 – фермент с наночастицами. Пробы мАспАТ подвергали прогреву при :1, 2 – 55 °С; 3, 4 – 60 °С; 5, 6 – 65 °С; 7, 8 –70 °С.  $A_0$  – активность исходного образца фермента;  $A_i$  –активность фермента после термообработки.

Рисунок 2 – Влияние НЧ- $\text{TiO}_2$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  на кинетику термоинактивации мАспАТ

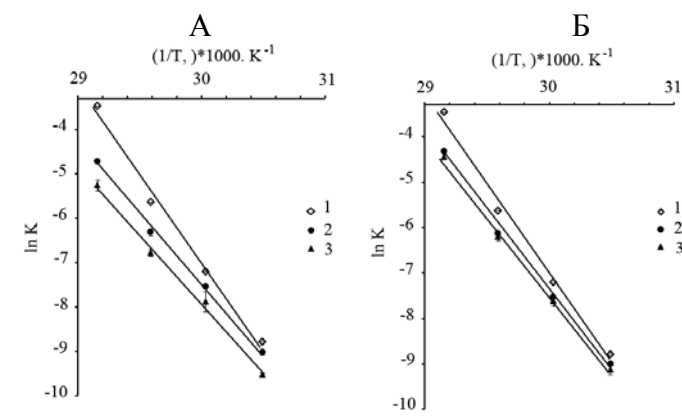
Модификация декстран сульфатом существенно повышает этот эффект, чего нельзя сказать о наночастицах магнетита. Их покрытие декстран сульфатом никоим образом не повлияло на  $k_{in}$  практически во всём температурном диапазоне (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние наночастиц  $\text{TiO}_2$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  на константы скорости термоинактивации мАспАТ

Образец \ Параметры	Значения $k_{in}$ в сек <sup>-1</sup> ( $\times 10^{-5}$ )			
	55 °С	60 °С	65 °С	70 °С
мАспАТ– контроль	22±1,8	98±4,5	360±22	1430±131
мАспАТ+ НЧ- $\text{TiO}_2$	15±0,6	61±3	183±15	610±41
мАспАТ+ НЧ- $\text{TiO}_2\text{ДС}$	9,7 ±0,3	48±7,7	115±9,5	596±58
мАспАТ+ НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	19,5±0,34	80,5±1,5	221±15,6	634±69
мАспАТ+ НЧ- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ДС}$	20±1,3	72±5,1	204±19	634±51,3

Тогда как в присутствии НЧ- $\text{TiO}_2\text{ДС}$  скорость термоинактивации мАспАТ при 60, 65 и 70 °С снижалась в 2,04, 3,13 и 2,3 раза соответственно по отношению к контролю. Особо следует указать на то, что в наибольшей степени термопротекторное действие НЧ- $\text{TiO}_2\text{ДС}$  проявилось при температуре близкой к  $t_{1/2}$ .

Для понимания механизма действия наночастиц на термоинактивацию мАспАТ был проведен расчет [21] термодинамических параметров быстрой стадии данного процесса из Аррениусовской зависимости логарифма константы скорости термоинактивации от температуры (рисунок 3). Результаты расчета представлены в таблице 2. Показано, что энтальпия активации процесса термоинактивации мАспАТ не зависит от типа НЧ и модификации их поверхности декстран сульфатом, а её величина находится в пределах характерных для большинства белков[11].



А) НЧ-TiO<sub>2</sub>; Б) НЧ-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
1) Контроль – мАспАТ без НЧ;  
2) мАспАТ с нативными НЧ;  
3) мАспАТ с НЧ покрытыми декстран сульфатом; ( $k_{in}$ ) – константа скорости термоинактивации мАспАТ в мин<sup>-1</sup>; Т – температура в градусах Кельвина.  
Рисунок 3 – Влияние НЧ на температурную зависимость констант скорости термоинактивации мАспАТ

В то же время следует отметить существенную зависимость величин  $E_a$  и  $\Delta H$  мАспАТ от типа НЧ и модификации их поверхности декстран сульфатом. В присутствии НЧ-TiO<sub>2</sub> энергия термоинактивации снизилась на 25%. Взаимодействие мАспАТ с НЧ-TiO<sub>2</sub>ДС понизило эту величину до 40%. Очень близкая картина имела место и в динамике изменений  $\Delta H$ . Однако, в присутствии НЧ-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и НЧ-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ДС изменения данных параметров были гораздо менее выражены. Обращает на себя внимание значительное снижение величины  $\Delta S$ , которое, как и в предыдущем случае оказалось наиболее выраженным для НЧ-TiO<sub>2</sub> и НЧ-TiO<sub>2</sub>ДС.

Это обстоятельство может быть интерпретировано как указание на формирование более жесткой конформации фермента при взаимодействии с НЧ на основе диоксида титана определяемой большим количеством слабых связей подлежащих разрушению при температурном воздействии[22].

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что взаимодействие мАспАТ с НЧ приводит к повышению конформационной стабильности фермента, которая в первую очередь определяется природой НЧ и может быть усилена покрытием поверхности НЧ декстран сульфатом.

Таблица 2 – Влияние нативных и модифицированных декстран сульфатом НЧ-TiO<sub>2</sub> и НЧ-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на термодинамические параметры мАспАТ

Образец \ Параметры	$E_a^{in}$ (кДж/моль)	$\Delta H$ (кДж/моль)	$\Delta S$ (Дж/моль*К)	$\Delta G$ (кДж/моль)
мАспАТ	328,0	325,9	674,6	104,6
мАспАТ+НЧ-TiO <sub>2</sub>	262,2	259,5	470,7	105,1
мАспАТ+НЧ-TiO <sub>2</sub> ДС	234,3	231,6	386,9	102,7
мАспАТ+НЧ- Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	288,6	285,8	549,9	103,0
мАспАТ+НЧ- Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ДС	285,6	285,9	551,1	102,7

Термодинамические параметры, характеризующие взаимодействие белков с НЧ могут существенно варьировать и определяются особенностями структуры тех или иных белков. Так, например, считается [23], что белки с лабильной конформацией формируют сильные взаимодействия с поверхностями вследствие энтропии пребывающей из изменений их конформации при адсорбции. Они способны образовывать множество нековалентных взаимодействий с поверхностью через модификации вторичной структуры. Белки с относительно жесткой конформацией сохраняют вторичную структуру и, следовательно, их адсорбция согласно [23] зависит от гидрофобных или электростатических взаимодействий.

Наши экспериментальные данные показывают, что молекулы мАспАТ адсорбированные на нативных и модифицированных декстран сульфатом НЧ оксидов

металлов имеют более жесткую конформацию, стремящуюся свести к минимуму деформацию структуры при нагревании.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными других исследований. Так, Xіue Jiang et al, доказали, что цитохром *c* адсорбируясь на поверхности наночастиц золота становится более термостабильным благодаря особой конформации гема, индуцированной температурным фактором [25]. Существенно возрастает термостабильность трипсина в комплексе с наночастицами [7]. Глюкозооксидаза адсорбированная на поверхности НЧ коллоидного золота [26] или НЧ на основе  $\text{CoFe}_2\text{O}_4 / \text{SiO}_2$  [27] имеет более высокую термостабильность чем свободный фермент. Взаимодействие белков с НЧ при нейтральном значении рН формируется благодаря образованию водородных связей, гидрофобным и электростатическим взаимодействиям, которые по мнению [7] должны быть основной движущей силой стабилизации. При этом конформационные изменения индуцируемые оксидами металлов во вторичной структуре, например, альбумина оказываются достаточно глубокими – имеет место трансформация  $\alpha$ -спиралей в  $\beta$ -складчатые слои[28].

### Выводы

Проведено сравнительное изучение кинетики термоинактивации митохондриального изофармента аспартатаминотрансферазы (мАспАТ) в присутствии нативных и модифицированных декстран сульфатом наночастиц  $\text{TiO}_2$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Термоинактивацию мАспАТ проводили при 45, 50, 55, 60, 65, 70 °С, рН равном 6,8 и концентрации фосфатного буферного раствора 5 ммоль/л. Наиболее эффективно как нативные, так и модифицированные декстран сульфатом НЧ проявляют своё термопротекторное действие при температуре 60 °С и выше. Константа скорости инактивации( $k_{in}$ ) мАспАТ существенно снижается в присутствии НЧ- $\text{TiO}_2$ . Модификация поверхности НЧ декстран сульфатом усиливает данный эффект. В наибольшей степени термопротекторное действие НЧ- $\text{TiO}_2$ ДС проявляется при температуре близкой к  $t_{1/2}$ (температура, при которой происходит потеря 50% активности фермента). У наночастиц магнетита термопротекторное действие проявлялось значительно слабее. Структурная стабильность мАспАТ в присутствии наночастиц охарактеризована термодинамическими параметрами –  $E_a^{in}$ (энергия инактивации),  $\Delta H$ (энтальпия),  $\Delta S$ (энтропия) и  $\Delta G$ (свободная энергия Гиббса) . На основании полученных результатов можно заключить, что взаимодействие мАспАТ с НЧ приводит к повышению конформационной жесткости фермента, которая в первую очередь определяется природой НЧ и может быть усилена покрытием поверхности НЧ декстран сульфатом.

*Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ-РФФИ №Б10Р-249*

### Список литературы

- 1.Nanoparticles – A Review / V. J. Mohanra [et al.] // Tropical J. of Pharmacy Res.–2006.– Vol. 5, №1. – P. 561–573.
- 2.Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Application / V. Arruebo [et al.] // J. of Nanomaterials. – 2007. – Vol. 12. – P. 1222–1229.
- 3.Norde, W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface / W. Norde // Adv. Colloid Interface Sci. – 1986. – Vol. 25, № 4. – P.267–340.
- 4.Surface-induced conformational changes in lattice model proteins by Monte Carlo simulation / V. Castells [et al.] // Phys. Rev. E. 2002. – Vol. 65. – P. 1–8.
- 5.Anomalous thermal denaturing of proteins adsorbed to nanoparticles / J.H. Teichroeb [et al.] // Eur. Phys. J. E. – 2006. – Vol. 21. – P. 19–24.
- 6.Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces / W. Shang [et al.] // Nano Lett. – 2007. – Vol. 7. – P. 1991–1995.
- 7.Self-assembled nanoparticles based on linoleic-acid modified chitosan: Stability and adsorption of trypsin / Chen-Guang Liu [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2006. – Vol. 62. – P. 293–298.

8. Взаимодействие митохондриальной аспартат аминотрансферазы с наночастицами коллоидного золота / А.Э. Салем [и др.] // Вестник Фонда Фундаментальных исследований. – 2014. – № 3. – С. 56–62.
9. Взаимодействие митохондриального кофермента аспартат-аминотрансферазы с наночастицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  / А.Э. Салем [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 142–146.
10. Взаимодействие нативных и модифицированных декстрана сульфатом наночастиц диоксид титана с митохондриальной аспартат аминотрансферазой / А.Э. Салем [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 177–182.
11. Joli M. Physical chemistry of proteins denaturation / M. Joli. – Mir Press, Moscow. – 1968.
12. Large-Scale Purification and Some Properties of the Mitochondrial Aspartate Aminotransferase from Pig Heart / D. Barra [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1976. – Vol. 64, №. 2. – P. 519–526.
13. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ) on *Mytilus* hemocytes / L. Canesi [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2010. – Vol. 96. – P. 151–158.
14. Peterson, G.L. Methods in enzymology / G.L. Peterson // Methods in enzymology. – 1983. – Vol. 91. – P. 95–119.
15. Karmen, A.A. Note on spectrophotometric assay of glutamic oxalocetic transaminase in human blood serum / A. A. Karmen // J. Clin. Invest. – 1955. – Vol. 34. – P. 131–135.
16. Further thermal characterization of an aspartate aminotransferase from halophilic organism / F. J. G. Muriana [et al.] // Biochem. J. – 1994. – Vol. 298. – P. 465–470.
17. Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface / Bertus Van Den Burg [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1994. – Vol. 220. – P. 981–985.
18. Thermal inactivation, denaturation and aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase / Golub N.V. [et al.] // Biophysical Chemistry. – 2008. – Vol. 135. – P. 125–131.
19. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface / A. E Nel [et al.] // Nat Mater. – 2009. – Vol. 8, №. 7. – P. 543–557.
20. Взаимодействие нативных и модифицированных декстрана сульфатом наночастиц диоксид титана с митохондриальной аспартат аминотрансферазой / А.Э. Салем [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 177–182.
21. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики // Издательство Московского Университета. – Москва, 1976. – С. 320.
22. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты // М. Мир, 1982. – Т. 1. – С. 389.
23. Further thermal characterization of an aspartate aminotransferase from halophilic organism / F. J. G. Muriana [et al.] // Biochem. J. – 1994. – Vol. 298. – P. 465–470.
24. Conformation of Human Carbonic Anhydrase II Variants Adsorbed to Silica Nanoparticles / P. Billsten / Langmuir. – 1999. – Vol. 15. – P. 6395–6399.
25. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review / C. J. Wilson // J. Tissue Eng. – 2005. – Vol. 11, № 1–2. – P. 1–18.
26. Immobilization of  $\beta$ -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis / M. L. Verma [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2012. – Vol. 50, № 2. – P. 432–437.
27. Cytochrome c Superstructure Biocomposite Nucleated by Gold Nanoparticle: Thermal Stability and Voltammetric Behavior / Xiue Jiang [et al.] // Biomacromolecules. – 2005. – Vol. 6. – P. 3030–3036.
28. Immobilization of glucose oxidase using  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  nanoparticles as carrier Hai Wang [et al.] // Applied Surface Science. – 2011. – Vol. 257. – P. 5739–5745.